



Smithsonian Tropical Research Institute

Minera  Panamá

## PROYECTO MINA DE COBRE PANAMÁ

### ESTUDIO DE IMPACTO AMBIENTAL (EsIA)

#### CATEGORIA III

### *INFORME TRIMESTRAL DEL PROYECTO DE CONSERVACIÓN EX SITU DE ESPECIES DE INTERÉS DE ANFIBIOS*

| Compromisos de EsIA<br>Aplicables                            | Período reportado  | Elaborado por                                            | Fecha de Emisión del<br>Reporte |
|--------------------------------------------------------------|--------------------|----------------------------------------------------------|---------------------------------|
| 13202, 13207<br>13208, 13212<br>13221, 13223<br>13232, 13233 | Febrero-Abril 2018 | INSTITUTO SMITSONIAN<br>DE INVESTIGACIONES<br>TROPICALES | 10/05/2018                      |

## **INFORME TRIMESTRAL DEL PROYECTO**

### **“LA CONSERVACIÓN EX-SITU DE RANAS DEL ÁREA DE DONOSO, RENOVACIÓN POR UN AÑO”**

**Período:** Febrero - Abril 2018

**Por:** Roberto Ibáñez D., Proyecto de Rescate y Conservación de Anfibios de Panamá, Smithsonian Tropical Research Institute (STRI)

**Fecha:** 10 de mayo de 2018

#### **Introducción**

El 15 de junio de 2017, Minera Panamá S.A. (MPSA) y el Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales (STRI) firmaron un acuerdo con el fin de extender el proyecto de conservación ex situ de anuros del área de Donoso por un año. Con este acuerdo se continuarán los esfuerzos de conservación e investigación que contribuirán al manejo y preservación de los anfibios de Donoso, enfocándose en las especies de interés (EdI). Este proyecto es coordinado por el Proyecto de Rescate y Conservación de Anfibios de Panamá (PARC) y es llevado a cabo en dos instalaciones del proyecto ubicadas en: (1) El Valle de Antón (PARC-El Valle) y (2) Gamboa (PARC-Gamboa), para la conservación de este amenazado grupo de vertebrados. En este informe se presentan los avances, según los objetivos acordados de este proyecto, realizados durante el período Febrero - Abril 2018.

***Objetivo 1. – Mantener y consolidar instalaciones para la cría y reproducción de poblaciones en cautividad de las especies de anfibios de interés de Donoso (fondos para un año adicional).***

Con el propósito de mejorar la cría y reproducción de anfibios en cautiverio, seguimos invirtiendo en la capacitación de personal. Durante este período, hemos tenido ocho pasantes, Kathleen Higgins, Valeria Franco, Orlando Garcés, Elliot Lassiter, Guadalupe Ureña y Karina Zurique (biólogos) en PARC-Gamboa y a Erika Herrera y José E. Alonso (moradores de El Valle) en PARC-El Valle. Algunos de ellos están siendo capacitados y esperamos poder considerarlos cuando se abran vacantes en el proyecto.

Se han realizado algunas reparaciones menores y trabajos de mantenimiento en ambas instalaciones, principalmente relacionadas a los aires acondicionados, bombas de agua, filtros de agua, plomería y sistema eléctrico. En PARC-Gamboa, hemos continuado trabajando en equipar el contenedor para mantener y reproducir ranas de la familia Dendrobatidae del área de Donoso. También, la firma de arquitectos Amador & Arquitectos Asociados ha continuado con el diseño de la pequeña edificación (150 m<sup>2</sup>) para la producción de insectos en PARC-Gamboa. Este diseño ya se encuentra en la etapa final de revisión, ya que tiene un 100% de desarrollo. Esta edificación permitirá mover la producción de insectos, lo cual liberará dos contenedores



**Producción de moscas de la fruta para alimento.**

con el fin de usarlos para albergar anfibios. Además, se continuaron los trabajos de adecuación de salones temporales para la producción de insectos en Gamboa, con el propósito de acelerar el equipamiento y habilitación de los contenedores para albergar anfibios. Iniciamos el poblamiento de estos salones temporales con colonias nuevas de insectos, lo cual hemos estamos

haciéndolo paulatinamente; ya que, primero debemos asegurarnos que la producción de insectos prospere adecuadamente, antes de mover su producción completamente a estos salones. Estaremos consolidando operaciones del PARC-El Valle y PARC-Gamboa en los

próximos meses; por lo que, durante este período planeamos el inicio del traslado de individuos de especies EdI al Gamboa-ARCC.

En ambas instalaciones del PARC se producen principalmente grillos, dos especies de moscas de las frutas, colémbolos, larvas de polilla, lombrices de tierra, cucarachas, cochinillas y larvas de escarabajos (“mealworms”) para alimentar a las poblaciones de anfibios en cautiverio. Durante el período Febrero - Abril, la producción de estos invertebrados supera al nivel requerido como alimento en PARC-Gamboa y PARC-El Valle, lo cual es deseable para amortiguar una caída repentina en la producción de alimento para los anfibios. No obstante, en PARC-El Valle hubo una caída en la producción de grillos, pero la misma ha se ha estado mitigando con el envío de cajas con huevos, ninfas y adultos de una instalación a la otra. La pasante Karina Zurique, Universidad de Panamá-McGill University, realizó un estudio con miras a cuantificar y mejorar la producción de moscas de las frutas en PARC-Gamboa. Ella encontró que diferentes tipos de recetas (i.e., normal, rica en calcio y rica en vitamina A) para la preparación de los medios de cultivo de las moscas *Drosophila melanogaster* generalmente no tienen un efecto sobre la producción de moscas, pero que ocasionalmente pueden existir diferencias cuando no se preparan los medios consistentemente o las condiciones de cultivo varían; por lo que, se requieren realizar más ensayos. Cada cultivo preparado con la receta normal produjo  $1.7 \pm 0.7$  gramos (promedio  $\pm$  95% IC) de moscas *D. melanogaster* en 29 días. Semanalmente preparamos 105 medios de cultivo de esta especie; por lo que, estimamos que estos medios producen un total  $178.5 \pm 73.5$  gramos de este alimento para los anfibios en el transcurso de 29 días. Además, observó una alta variación en la producción de estas moscas en los cultivos; por consiguiente, debemos mantener una producción alta de éste y otros tipos de alimento para evitar que ocurran períodos de escasez. Este tipo de resultados es importante para estimar y mantener una producción adecuada de alimento.

En este período se hizo la vigilancia sanitaria preventiva de los 88 tanques donde se mantienen los anuros provenientes de Donoso, o descendientes de éstos, en la instalación del proyecto en El Valle. Se obtuvieron los resultados de las pruebas para detectar la presencia del hongo quitridio de los anfibios (*Batrachochytrium dendrobatidis*) en al menos un individuo por tanque. Todos los hisopados de piel obtenidos de estos animales, resultaron negativos para este hongo; por consiguiente, *B. dendrobatidis* no es una amenaza para nuestras poblaciones ex situ. Además, se examinaron las heces depositadas colectivamente por el grupo de individuos

que se mantienen en cada tanque. Según nuestros procedimientos preestablecidos para el control de endoparásitos, solamente tres tanques tenían muestras fecales con un nivel elevado de parasitismo (i.e.,  $\geq 3+$ ); por lo que, se inició el tratamiento de todos los individuos de esos tanques con medicamentos antihelmínticos. Dicho tratamiento finalizará en el próximo período. Basado en estos resultados y en la observación diaria de los animales en cautiverio, se puede afirmar que los individuos de la población ex situ de PARC-El Valle, en términos generales, se encuentran en un estado saludable.

Los números de individuos de las poblaciones en cautiverio de las especies de anfibios del área de Donoso, que manteníamos al 30 de abril de 2018, en nuestras instalaciones eran:

| Especie                      | Machos     | Hembras    | Juveniles  | Total       | Reproducción en cautiverio | Renacuajos | Instalación                |
|------------------------------|------------|------------|------------|-------------|----------------------------|------------|----------------------------|
| <i>Andinobates geminisae</i> | 9          | 11         | 195        | 215         | +                          | ~70        | PARC-Gamboa                |
| <i>Atelopus varius</i>       | 156        | 154        | 483        | 793         | +                          | ~300       | PARC-El Valle y Gamboa     |
| <i>Craugastor evanescio</i>  | 31         | 27         | 38         | 96          | +                          | -          | PARC-El Valle y Gamboa     |
| <i>Ecnomiohyla miliaria</i>  | 2          | 0          | 0          | 2           | -                          | 0          | PARC-El Valle              |
| <i>E. veraguensis</i>        | 2          | 0          | 0          | 2           | -                          | 0          | PARC-El Valle              |
| <i>Incilius coniferus</i>    | 2          | 1          | 0          | 3           | -                          | 0          | PARC-El Valle (exhibición) |
| <i>Gastrotheca cornuta</i>   | 7          | 1          | 4          | 12          | +                          | -          | PARC-El Valle              |
| <i>Oophaga vicentei</i>      | 14         | 21         | 22         | 57          | +                          | ~10        | PARC-Gamboa                |
| <b>Total</b>                 | <b>233</b> | <b>215</b> | <b>742</b> | <b>1180</b> |                            | ~380       | PARC-El Valle y Gamboa     |

Nota: *Craugastor evanescio* y *Gastrotheca cornuta* no presentan etapa de larvaria o renacuajo libre.

Al 30 de abril de 2018, manteníamos 1180 ranas de 8 especies de anuros del área de Donoso. Entre las especies que se mantienen en cautiverio están las cuatro Especies de Interés (EdI) del Proyecto Mina de Cobre Panamá: *Andinobates geminisae*, *Atelopus varius*, *Craugastor evanescio* y *Gastrotheca cornuta*. Adicionalmente, el proyecto PARC mantiene especies endémicas de distribución restringida: *Ecnomiohyla veraguensis* y *Oophaga vicentei*, que se encuentran en el área de Donoso y las cuales pueden ser consideradas como especies en peligro y vulnerable, respectivamente. Otras especies, también, provenientes del área de desarrollo del Proyecto Mina de Cobre Panamá, como *Ecnomiohyla miliaria* e *Incilius coniferus*, se tienen con el propósito de estudiarlas por ser especies raras o para exhibición.

Actualmente, tenemos suficientes individuos fundadores para la especie *Craugastor evanesco*. Es recomendable obtener más individuos fundadores de *Andinobates geminisae* (12 machos y 12 hembras), *Oophaga vicentei* (8 machos) y *Atelopus varius* (6-10 hembras de la población en Nuevo Petaquilla) y *Gastrotheca cornuta* (13 machos y 19 hembras) para obtener una representatividad adecuada de su diversidad genética. La especie *G. cornuta* ha sido particularmente difícil de encontrar; por lo que, será necesario realizar más búsquedas de las que teníamos previstas.

Durante el período Febrero - Abril, hubo varios eventos de reproducción de 10 parejas de *Andinobates geminisae*. Al final del período, estimamos que se tenían unos 70 renacuajos de *A. geminisae*. También, hubo un reclutamiento considerable, i.e., 56 individuos, a la población en cautiverio. No obstante, estos eventos reproductivos y los descendientes que se añaden a la población, aún constituyen el inicio del establecimiento de poblaciones estables en cautiverio del programa de conservación ex situ. Aunque una pareja de *O. vicentei* se reprodujo exitosamente, la reproducción de esta especie ha mantenido a un nivel relativamente bajo, similar al período anterior, a pesar de que los tanques tienen bromelias y una ligera capa de hojarasca. Vamos a modificar los tanques que contienen a esta especie para mejorar la reproducción de esta especie, añadiendo más bromelias por tanque, una vez se complete el contenedor para las ranas de la familia Dendrobatidae. La bióloga Kathleen Higgins, estudiante de maestría de Simon Fraser University, continuó realizando su pasantía orientada a aumentar el éxito reproductivo de los dendrobátidos provenientes de Donoso. Gracias a sus observaciones y al estudio que adelanta sobre la reproducción y supervivencia de renacuajos y post-metamorfos ha sido posible sostener el reclutamiento de individuos a las poblaciones de estas especies que mantenemos en cautiverio.

Seguimos notando que la frecuencia del "Spindly Leg Syndrome" (SLS) en los renacuajos y post-metamorfos de estas especies se mantiene relativamente baja; lo cual, constituye un avance, ya que este síndrome impide el movimiento normal para una adecuada alimentación y conlleva a la muerte de los individuos post-metamorfos. La causa de este síndrome aún no ha sido dilucidada, pero los veterinarios del proyecto siguen investigando en este problema. La pasante Kathleen Higgins inició otro experimento sobre el efecto que tienen el grado de cuidado y la calidad del agua en la prevalencia del SLS en renacuajos de *Andinobates geminisae*. También, estamos planeando un experimento sobre SLS en renacuajos de

*Atelopus* spp., para el cual obtuvimos fondos y aprobación del protocolo por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales del STRI.

En este período, dos parejas de *Atelopus varius* pusieron masas de huevos. Actualmente contamos con unos 300 renacuajos descendientes de estas dos parejas, incluyendo algunos de la pareja que puso huevos en el período anterior. La mayoría de los descendientes de esta última pareja se han transformado en post-metamorfos. No se reprodujeron parejas de *Craugastor evanescens* de manera exitosa; ya que, aunque pusieron huevos, éstos resultaron infértiles.

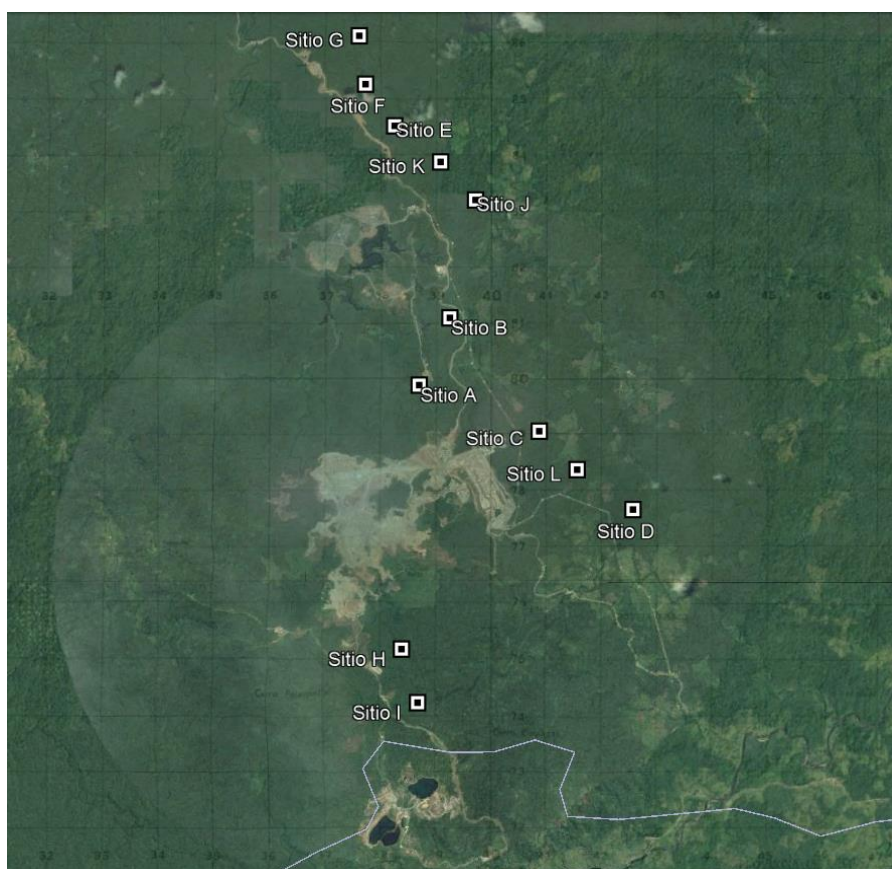
Adicionalmente, se ha continuado con la actualización de datos de los individuos de Donoso en la base de datos “Zoological Information Management System” (ZIMS) (<http://www2.isis.org>), que facilita el manejo del inventario de animales, el control de la conformación genética y demográfica de las colecciones de animales vivos, la identificación de animales no relacionados para realizar cruces, el mantenimiento de un registro del estado de salud y el tratamiento que se le ha dado a cada individuo, entre otros.

## **Objetivo 2. – Iniciar ensayos de liberación de anfibios en el área de Donoso.**

Continuamos los trabajos sobre el ensayo de liberación en: (1) el sitio 15k+700 (8.91584°N 80.66299°O) donde se liberaron ranas *Atelopus varius* el 17 de enero de 2018, y (2) el sitio cercano a la torre 29 de la línea del tendido eléctrico (8.91151°N 80.65765°O) donde no se liberaron ranas. Este segundo sitio, es visitado para comparar cambios en la prevalencia del *B. dendrobatidis* en la comunidad de anfibios, en ausencia de un aumento de ranas (por liberación). Durante estos trabajos, además de realizar búsquedas de individuos liberados, también obtuvimos muestras de la piel con hisopos de las ranas de todas las especies que fueron encontradas, para darle seguimiento a la prevalencia del *B. dendrobatidis* en la comunidad de anfibios de ambos sitios. En este período, nuestra programación de trabajo de campo fue alterada, debido a la huelga de un sindicato de trabajadores que no permitió el acceso y la movilidad en el área.

Los análisis de qPCR de las muestras de piel que fueron tomadas en ambos sitios previamente a la liberación, durante 10-11 de enero de 2018, corroboraron la presencia del *B. dendrobatidis* en la comunidad de anfibios de los dos sitios (ver Objetivo 4). De los 19 individuos liberados de *Atelopus varius* que fueron encontrados en el sitio de 15k+700 el 28 de enero, dos presentaban una baja infección inicial por *B. dendrobatidis* (28-55 copias de ITS1). En 19-23 de febrero, se observaron 5 individuos de *Atelopus varius* que habían sido marcadas y liberadas, de las cuales uno estaba infectado (784 copias de ITS1). Sin embargo, en las búsquedas posteriores que se hicieron durante 2-6 y 23-27 de abril, no se encontraron individuos liberados de esta especie.

Adicionalmente, hasta donde nos fue posible, revisamos semanalmente a los individuos que se mantenían dentro de los mesocosmos para el estudio de la producción de toxinas en su piel, específicamente tetrodotoxina. El 12 de febrero se retiraron 5 ranas de los mesocosmos, luego de estar aproximadamente un mes dentro de éstos. Posteriormente, el 5 de abril se retiraron las 7 ranas restantes. Al momento de retirarlas, se les obtuvo una muestra de piel con un hisopo para determinar si existen bacterias que producen esta toxina. Luego, a éstas se les aplicó la eutanasia y se les extrajo la piel para un análisis químico que permita establecer la presencia y producción de toxinas en las glándulas de su piel. Este estudio es importante en el fin de conocer si las ranas nacidas y mantenidas en cautiverio poseen o pueden readquirir las toxinas que les ayudan a defenderse de depredadores. Los análisis químicos serán realizados por un colaborador de Villanova University en los EEUU; por lo que, elaboramos una solicitud de permiso de exportación de las muestras al Ministerio de Ambiente de Panamá.



**Sitios potenciales para el próximo ensayo de liberación por evaluar**

Próximamente, estaremos iniciando los trabajos de campo para el segundo ensayo de liberación. Ya hemos localizado en mapa a 12 sitios potenciales, los cuales estaremos explorando a finales de mayo, con el propósito de seleccionar dos sitios adecuados, colocar data loggers y demarcar los transectos a lo largo de los arroyos. También, solicitamos información meteorológica para determinar el momento o período más adecuado del año para realizar este segundo ensayo de liberación.

***Objetivo 3. – Realizar expediciones para recolectar ciertas especies de anfibios en riesgo en el área de Donoso.***

Durante este período, no realizamos expediciones de varios días de duración con el objetivo primordial de buscar y coleccionar individuos de las Especies de Interés (EdI); aunque, estuvimos planificando una expedición a Fardalito (FA-11), principalmente para recolectar más individuos

fundadores de *A. geminisae*. El sitio Fardalito (FA-11) es la localidad más próxima conocida, en donde anteriormente hemos encontrado individuos de la rana *A. geminisae*. Esta expedición se llevará a cabo en el próximo trimestre.

**Objetivo 4. - Estudio de los hongos patógenos de anfibios en la región de Donoso.**

Durante este período, estamos manteniendo a individuos de *Atelopus varius*, nacidos en cautiverio a que maduren hasta una talla adecuada, con el propósito de utilizar una porción de éstos en experimentos con hongos (*i.e.*, *B. dendrobatidis* y *F. keratoplasticum*) y tratamientos (*i.e.*, soluciones de Itraconazol y Betadine). Estos experimentos son importantes para determinar si existe una interacción entre ambos hongos que aumenta la mortalidad en ranas y determinar cuáles tratamientos son los más indicados para curarlas. No obstante, aún debemos obtener las aprobaciones necesarias para realizar estos experimentos por parte del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales. Al final de este período, llegaron los insumos y reactivos (*i.e.*, cebadores, sonda y master mix) que nos hacían falta para continuar ensayos para la búsqueda de técnicas moleculares para la detección de *F. keratoplasticum*; por lo que, estaremos retomando estos ensayos en los próximos días.

En relación a la prevalencia del hongo *B. dendrobatidis* en los anfibios que fueron encontrados en el área de Donoso, durante los muestreos de las comunidades de anfibios en el sitio del ensayo de liberación (15k+700) y el sitio donde no se liberaron ranas (ca. Torre 29), los resultados de los análisis de qPCR se resumen en el cuadro siguiente:

| Fechas         | Sitio        | Total de ranas | No. de ranas infectadas | Prevalencia (%) |
|----------------|--------------|----------------|-------------------------|-----------------|
| Enero 10 - 11  | 15k+700      | 34             | 14                      | 41.2            |
|                | ca. Torre 29 | 28             | 15                      | 53.6            |
| Febrero 19 -20 | 15k+700      | 4              | 1                       | 25.0            |
|                | ca. Torre 29 | 5              | 1                       | 20.0            |
| Abril 3 - 5    | 15k+700      | 23             | 5                       | 21.7            |
|                | ca. Torre 29 | 17             | 4                       | 23.5            |

El hongo *B. dendrobatidis* se encuentra en la comunidad de anfibios de ambos sitios con una prevalencia similar. Se registró una prevalencia mayor del *B. dendrobatidis* en el muestreo del mes de enero. Los resultados de la intensidad de la infección o carga del *B. dendrobatidis* (copias de ITS1) para la comunidad de anfibios están siendo procesados y se presentarán en el próximo informe.